

РЕГУЛЯЦИЯ ФЛАВОНОИДАМИ КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМЫХ ПРОЦЕССОВ В МИТОХОНДРИЯХ КАРДИОМИОЦИТОВ

Коваленя Т. А.¹, Лапшина Е. А.¹, Островская О. Б.²,
Климович И. И.², Заводник И. Б.¹

¹Гродненский государственный университет имени Янки Купалы

²Гродненский государственный медицинский университет
Гродно, Беларусь

Введение. Митохондрии, динамичные клеточные органеллы, контролируют клеточную сигнализацию, интегрируют метаболические потоки и представляют удобную модель субклеточной подсистемы, позволяющей оценить ключевые процессы в клетке в норме и при патологии и выяснять, каким образом функциональные перестройки системы трансформируются в патологические и каким образом можно корректировать этот процесс. Повреждения структуры и дисфункция митохондрий, сопровождаемые нарушением энергетики клетки и окислительным стрессом, связаны с нарушением кальциевого гомеостаза и приводят к ряду патологий (сердечно-сосудистые заболевания, диабет, токсическое поражение, ожирение). Сердце – постоянно активная мышца, потребляющая значительное количество энергии, которая запасается за счет окислительного фосфорилирования, катализируемого митохондриями. Чтобы обеспечить достаточное количество АТФ, необходимо значительное количество митохондрий, которые занимают около одной трети общего объема кардиомиоцитов. Ионы кальция играют центральную роль в контроле важнейших функций клеток сердечной мышцы, в том числе в регуляции сократительной активности кардиомиоцитов. Регуляция внутриклеточной концентрации свободного кальция ($[Ca^{2+}]_i$) представляется определяющим фактором для процесса жизни и смерти кардиомиоцитов. При этом митохондрии выступают в качестве важнейшего сенсора кальциевого сигнала в кардиомиоцитах. Митохондриальное поглощение и освобождение ионов Ca^{2+} представляет основной механизм регуляции производства АТФ для удовлетворения энергетических потребностей кардиомиоцитов, но также является повреждающим фактором при перегрузке ионами кальция, окислительном стрессе, инициации гибели клеток.

Флавоноиды, вторичные метаболиты высших растений, не синтезируемые в животных тканях, обладают рядом важных биохимических и фармакологических свойств, демонстрируют многочисленные благоприятные эффекты как в экспериментах *in vivo*, так и *in vitro*, способны предотвращать развитие неврологических, сердечно-сосудистых, онкологических заболеваний, диабета, токсических повреждений печени и ряда других.

Цель. Выяснить механизмы регуляции флавоноидами (кверцетин, нарингин, нарингенин) кальций-зависимых процессов в митохондриях кардиомиоцитов и оценить возможность коррекции флавоноидами нарушений митохондрий кардиомиоцитов *in vivo* и нагрузке ионами кальция *in vitro*.

Методы исследования. *Выделение митохондрий сердца крысы.* Митохондрии кардиомиоцитов выделяли методом дифференциального центрифугирования. Использовали среду выделения, содержащую 0,25 М сахарозу, 0,025 М Трис-НСl, 0,00005 М ЭДТА и 0,1% БСА, pH 7,4. Изолированное сердце быстро переносили в охлажденный 0,9% раствор KCl (+4 °C) и тщательно отмывали от крови. Мышечную ткань взвешивали, измельчали ножницами на льду и гомогенизировали с помощью стеклянного гомогенизатора с тефлоновым пестиком в среде выделения при температуре +4 °C. Ядерную фракцию удаляли центрифугированием при 650 g (10 мин, +4 °C) (центрифуга Hermle Z 32 НК, Hermle Labortechnik GmbH, Германия). Митохондрии осаждали центрифугированием при 11 000 g (10 мин, +4 °C) и промывали в среде выделения.

Структура и функциональные параметры изолированных митохондрий сердца крысы. На митохондрий сердца крыс (5 мг/мл) воздействовали ионами Ca^{2+} (концентрация свободного Ca^{2+} = 550 мкМ), флавоноидом нарингином (200 мкМ), и ионами Ca^{2+} (550 мкМ) + нарингин (200 мкМ) в среде, содержащей 0,25 М сахарозы, 0,025 М Трис-НСl и 0,00005 М ЭГТА, pH 7,4, в течение 30 мин (25°C) *in vitro*. Формирование пор высокой проницаемости митохондрий (МРТР) определяли по изменению оптической плотности суспензии митохондрий при 540 нм и 30 °C в среде, содержащей 0,12 М KCl, 0,02 М Трис-НСl, 0,002 М KH_2PO_4 и 0,0005 (или 0,00005) М ЭГТА, pH 7,4, как описано нами ранее. Изолированные митохондрии сердца (0,5 мг белка/мл) вносили в среду, содержащую субстрат (5 мМ сукцинат). Через 5 минут инкубации вносили ионы Ca^{2+} или флавоноид нарингин и измеряли скорость ($\Delta D_{540}/\text{мин}$) терминальной фазы набухания. Мембранный потенциал митохондрий сердца определяли спектрофлуориметрически, используя положительно заряженный липофильный флуоресцентный зонд сафранин О (8 мкМ) в среде, содержащей 200 мМ сахарозы, 10 мМ Трис-НСl, 1 мМ KH_2PO_4 , 5 мМ MgSO_4 , 0,00005 М ЭГТА, субстрат сукцинат 5 мМ, pH 7,4, 27°C. Скорость потребления кислорода изолированными митохондриями (0,5 мг белка/мл) в отсутствие и в присутствии ионов кальция и флавоноидов регистрировали полярографически, используя электрод Кларка («Hansatech Instruments Limited», Великобритания), при постоянном легком перемешивании в среде 0,125 М KCl, 0,05 М сахарозы, 0,01 М Трис-НСl, 0,0025 М KH_2PO_4 , 0,005 М MgSO_4 , pH 7,2, 25 °C.

Результаты и их обсуждение. Митохондриальный захват (и выброс) ионов Ca^{2+} регулирует ряд важнейших митохондриальных и клеточных

функций, нарушения кальциевого гомеостаза и избыточное накопление ионов Ca^{2+} представляет один из важнейших повреждающих факторов. В среде, не содержащей ЭГТА, ионы экзогенного кальция (20-60 мкМ) дозозависимо индуцировали выраженные нарушения ультраструктуры митохондрий кардиомиоцитов крыс, повышали гетерогенность популяции, увеличивали число набухших органелл со значительными изменениями и нарушенной нативной структурой внутренней мембраны, уменьшали число крист, увеличивали межкристные промежутки. Ультраструктурные нарушения в митохондриях сердца были связаны с индуцированным кальцием, открытием пор высокой проницаемости и деполяризацией мембраны. Малые концентрации свободных ионов экзогенного Ca^{2+} (40-250 нМ) дозозависимо уменьшали АДФ-зависимую скорость потребления кислорода V_3 митохондриями сердца без существенного изменения эффективности потребления кислорода. Оцененное нами значение кажущейся константы Михаэлиса (K_m) образования МРТР для митохондрий сердца оказалось равно 350 ± 50 мкМ Ca^{2+} , что говорит о том, что чувствительность к ионам Ca^{2+} значительно ниже в случае открытия МРТР и значительно выше в случае торможения дыхания по сравнению с митохондриями печени. Воздействие на митохондрии сердца флавоноида нарингина (200 мкМ) увеличивало среднюю площадь сечения и периметр митохондрий, стимулировало набухание митохондрий и потерю мембранного потенциала (25-100 мкМ) в отсутствие Ca^{2+} , но частично предотвращало индуцированные ионами Ca^{2+} морфологические превращения (200 мкМ) в митохондриях, дозозависимо (10-75 мкМ) снижало скорость потребления кислорода V_3 и V_2 в отсутствие или в присутствии ионов Ca^{2+} . Высокие концентрации нарингина (75 мкМ) ингибировали Ca^{2+} -стимулируемое открытие МРТР.

Длительное введение флавоноида нарингина (40 мг/кг) на фоне алкоголизации частично предотвращало развитие токсического эффекта этанола у крыс, восстанавливало параметры потребления кислорода митохондриями сердца (нормализовало коэффициенты фосфорилирования АДФ/О и дыхательного контроля V_3/V_2), снижало скорость Ca^{2+} -индуцированного набухания митохондрий сердца, что отражает повышение устойчивости митохондрий сердца к воздействию ионов кальция.

Выводы. Результаты работы продемонстрировали высокий биохимический потенциал ряда растительных полифенолов как эффективных регуляторов митохондриальных процессов и корректоров митохондриальной дисфункции, связанной с нарушением кальциевого гомеостаза. Благоприятные эффекты флавоноидов могут быть связаны с прямым взаимодействием с мембраной и комплексами электрон-транспортной цепи митохондрий кардиомиоцитов, ионотропными свойствами флавоноидов.